

МОДИФИКАЦИЯ САМОАССОЦИИРУЮЩЕГО ПЕПТИДА L₆KD ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ АКТИВНЫХ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЯ В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

© 2024 г. А. С. Комолов¹ *, И. И. Губайдуллин^{1, 2}, А. Ю. Николаева¹,
Е. С. Бобров¹, Е. П. Санникова¹, Д. Г. Козлов¹

¹Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, 123182 Россия

²“Курчатовский геномный центр”, Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”,
Москва, 117545 Россия

*e-mail: askomolov@mail.ru

Поступила в редакцию 31.07.2024 г.

После доработки 30.08.2024 г.

Принята к публикации 09.09.2024 г.

Синтез биологически активных рекомбинантных белков и пептидов в форме активных телец включения (АТВ) решает задачу снижения себестоимости производства. Ранее нами была разработана оригинальная платформа для получения АТВ в клетках *Escherichia coli*. Она включала N-концевой самоассоциирующий пептид (САП) L₆KD, слитый с белком SUMO (Smt3) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, известным своей шаперонной активностью. Было показано, что АТВ, синтезируемые молекулами данной платформы, чувствительны к ультразвуковой и экструзионной дезинтеграции клеток, что приводило к потерям на этапе фракционирования клеточного лизата. Теперь, с целью увеличения прочности АТВ, мы исследовали модификации базового САП. В частности, увеличивали гидрофобное ядро САП, а также попытались дополнить межмолекулярные взаимодействия между САП дисульфидными или ионными связями. Наилучшие результаты зарегистрированы для пептидов с увеличенной гидрофобностью (L₈KD), а также для содержащих последовательности 2–4 остатков цистеина непосредственно на N-конце гидрофобного ядра САП (C₂L₆KD, C₃L₆KD, C₄L₆KD). Интеграция остатков цистеина в отдалении от гидрофобного ядра САП (C₂G₃L₆KD, L₆KDGC₂), а также формирование дополнительных ионных связей (KDL₆KD, KDL₈KD) не привели к повышению стабильности АТВ. Показано, что предложенные модификации САП практически не влияли на синтез целевого белка. В условиях ультразвуковой дезинтеграции лучшие варианты САП повышали выход АТВ в среднем на 30–40%. Этот эффект также сохранялся в условиях экструзионной дезинтеграции *E. coli* с использованием гомогенизатора высокого давления.

Ключевые слова: рекомбинантный белок, самоассоциирующий пептид, активные тельца включения, биологически активный белок, *Escherichia coli*, дезинтеграция клеток

DOI: 10.56304/S0234275824050089

Получение рекомбинантных белков – важная и активно развивающаяся область биотехнологии, продукты которой находят широкое применение при решении исследовательских, терапевтических, диагностических и промышленных задач. Несмотря на высокие уровни синтеза, производство биологически активных рекомбинантных белков и пептидов в большинстве случаев сохраняет высокую стоимость из-за дорогостоящей стадии очистки целевого продукта, в том числе с использованием многоэтапной хроматографии.

Список сокращений: АТВ – активные тельца включения; САП – самоассоциирующий пептид; ТВ – тельца включения; УЗД – ультразвуковое диспергирование; ФД – ферментативная дезинтеграция; ЭД – экструзионный дезинтегратор; SUMO (small ubiquitin-like protein modifier) – убиквитинподобный белок-модификатор.

Технология активных телец включения (АТВ) предлагает один из относительно новых подходов к биосинтезу и очистке рекомбинантных белков и пептидов [1–3]. При ее реализации клетки *Escherichia coli* синтезируют слитную молекулу, состоящую из следующих компонентов: (i) белка платформы, включающего самоассоциирующий пептид (САП) и адаптерный элемент; (ii) последовательности целевого белка. В отличие от обычных телец включения (ТВ), при формировании которых целевая молекула агрегирует, в АТВ белок попадает в биологически активном состоянии, так как их формирование происходит за счет САП. В ходе синтеза макромолекулярные комплексы АТВ обычно образуют уплотнения в клетке, визуально похожие на классические ТВ, либо локализуются на внутренней мембране [2].

При разработке АТВ в качестве САП часто используют “сурфактантподобные” пептиды, состоящие из “гидрофобного хвоста”, включающего последовательность из нескольких гидрофобных аминокислот, и “гидрофильной головы”, состоящей из заряженных аминокислот [4]. Также применяют САП, которые формируют β -слои или более сложные структуры [5]. Варианты САП и адаптерных элементов, используемых для разработки АТВ, представлены в обзорах [4, 6].

Этапы получения целевого продукта с помощью технологии АТВ включают: культивирование клеток и синтез АТВ; дезинтеграцию клеток и фракционирование нерастворимых АТВ; протеолитическую обработку АТВ и высвобождение целевого белка; фракционирование растворимого целевого белка. Таким образом, при использовании этой технологии синтезированный целевой белок очищают от клеточных примесей без использования хроматографии, так как растворимые белки клеток удаляют на первом этапе фракционирования, а нерастворимые – на втором.

Ранее мы разработали оригинальную платформу для получения АТВ в клетках *E. coli*. Платформа включала N-концевой САП L₆KD, обладающий сурфактантподобной структурой, слитый с белком SUMO (Smt3) дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, известным своей шаперонной активностью. В C-концевой части слитной молекулы располагался целевой белок или пептид [1].

Высокая эффективность синтеза АТВ с использованием платформы L₆KD-SUMO продемонстрирована на белках, различавшихся молекулярной массой (от 2.5 до 36 кДа), четвертичной структурой, склонностью к корректному сворачиванию и наличием дисульфидных связей [1]. С помощью корреляционной световой и электронной микроскопии было показано, что *in vivo* синтезируемые АТВ формируют мицеллярные структуры (нанотрубки). Такое строение АТВ обуславливает их повышенную склонность к разрушению в условиях механической дезинтеграции клеток. Это подтверждено экспериментально [1] и согласуется с ранее представленными данными по ультразвуковой дезинтеграции мицелл, сформированных химически синтезированными сурфактантподобными пептидами [7]. Фрагментация или даже дезинтеграция АТВ, которая происходит в условиях механического разрушения клеток, ведет к снижению их седиментации при фракционировании клеточного лизата и, как следствие, к значительным потерям целевого белка. Этого недостатка лишено ферментативное разрушение клеток с использованием лизоцима [1], но данный процесс не подходит для масштабного производства.

Таким образом, разработка АТВ, обладающих повышенной устойчивостью к механической дезинтеграции, – задача актуальная и ее решение

может определить развитие технологии в будущем. В представленной работе стояла задача повышения стабильности АТВ в условиях ультразвуковой и экструзионной дезинтеграции клеток, для решения которой мы опробовали подход, основанный на модификации сурфактантподобного САП L₆KD.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Конструирование экспрессионных плазмид

Конструирование плазмид проводили с использованием стандартных процедур на базе экспрессионного вектора pET28b(+) (Novagen, США).

Для амплификации плазмид использовали штамм *E. coli* TOP10. Трансформанты растили при 37°C на среде LB (VWR Chemicals, США) с добавкой канамицина (30 мкг/мл) на ротационном шейкере со скоростью перемешивания 250 об/мин.

Ряд плазмид, использованных в работе, был сконструирован ранее. В частности, это: (i) вспомогательные плазмиды pET28s-His₁₀-SUMO-His₆ и pET28s-L₆KD-sfGFP, содержавшие уникальный сайт *Bam*HI между последовательностями SUMO и His₆, а также L₆KD и sfGFP соответственно; (ii) плазида pET28s-L₆KD-SUMO-sfGFP, используемая для синтеза контрольных АТВ, формируемых базовым САП L₆KD [1].

Плазида pET28s-His₁₀-SUMO-sfGFP для синтеза контрольного полностью растворимого слитного белка His₁₀-SUMO-sfGFP была сконструирована путем замены фрагмента *Bam*HI/*Xho*I плазмиды pET28s-His₁₀-SUMO-His₆, кодирующего тэг His₆, на фрагмент *Bam*HI/*Xho*I плазмиды pET28s-L₆KD-sfGFP, кодирующий sfGFP.

Остальные плазмиды, полученные в ходе работы, приведены в табл. 1.

За исключением pET28s-L₆KDGSC₂-SUMO-sfGFP, остальные плазмиды, указанные в табл. 1, были сконструированы путем замены фрагмента *Nco*I/*Xho*I ДНК плазмиды pET28s-His₁₀-SUMO-His₆ на целевые *Nco*I/*Xho*I фрагменты, полученные путем ПЦР-амплификации плазмиды pET28s-GL₆KD-SUMO-sfGFP. Для ПЦР-амплификации целевых фрагментов ДНК использовали соответствующие прямые праймеры и обратный праймер N619 (см. табл. 1).

Плазида pET28s-L₆KDGSC₂-SUMO-sfGFP была сконструирована путем замены фрагмента *Bam*HI/*Xho*I плазмиды pET28s-L₆KD-sfGFP [1] на *Bgl*II/*Xho*I-фрагмент, полученный в результате ПЦР-амплификации плазмиды pET28s-GL₆KD-SUMO-sfGFP, проведенной с использованием праймеров N2050 и N619 (см. табл. 1).

Сконструированные плазмиды использовали для синтеза соответствующих слитных белков и АТВ на их основе.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе, и сконструированные плазмиды
Table 1. Primers used and plasmids constructed

Праймер		Плаزمида
название	последовательность, 5' → 3'	
N1482	tataccatggggtttgttgctgttactgctgcttaaggat	pET28s-L ₈ KD-SUMO-sfGFP
N1593	ataccatgggtaaagatctgctgttactgctgcttaaggatggat	pET28s-KDL ₆ KD-SUMO-sfGFP
N1594	ataccatgggtaaagatctgctgttgctgttactgctgcttaaggatggat	pET28s-KDL ₈ KD-SUMO-sfGFP
N2046	tataccatggggtgttgctgttactgctgttg	pET28s-C ₂ L ₆ KD-SUMO-sfGFP
N2090	tatccatggggtgttgctgttactgctgttg	pET28s-C ₃ L ₆ KD-SUMO-sfGFP
N2091	tatccatggggtgttgctgttactgctgttg	pET28s-C ₄ L ₆ KD-SUMO-sfGFP
N2047	tataccatggggtgttcggaggtgttgctgttactgctgttg	pET28s-C ₂ G ₃ L ₆ KD-SUMO-sfGFP
N2050	atatagatcttgtgcgactcagaagcaatca	pET28s-L ₆ KD-GSC ₂ -SUMO-sfGFP
N619	ggtggcagcagccaactcagctt	Все

Синтез и фракционирование целевых белков

Биосинтез целевых белков проводили в клетках *E. coli*, штамм BL21(DE3). С этой целью клетки *E. coli* трансформировали сконструированными плазмидами, описанными в предыдущем разделе. Полученные трансформанты выращивали в среде Terrific Broth (TRB), содержащей 24 г/л дрожжевого экстракта, 12 г/л соевого пептона, 2 мМ сульфат магния, 5 г/л глицерина, 2 г/л лактозы, 90 мг/л канамицина в 100 мМ фосфатном буфере (рН 7.0). Индуктором синтеза целевого белка в составе среды TRB служила лактоза.

Культивирование трансформантов проводили в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 50 мл среды TRB. Засев производили петлей: в среду вносили смесь 5–10 клонов трансформантов. Клетки растили на ротационном шейкере (Eppendorf, Германия) при скорости перемешивания 250 об./мин и 22°C в течение 48 ч в условиях автоиндукции. Клеточную биомассу осаждали центрифугированием при 9000 g в течение 5 мин.

Дезинтеграцию выращенных клеток проводили перечисленными ниже тремя способами:

1) С использованием лизоцима (ферментативная дезинтеграция, ФД): клеточную биомассу ресуспендировали в буферном растворе (50 мМ Трис, 50 мМ NaCl, рН 8.5) до финальной плотности OD₆₀₀ = 15 о.е. К суспензии добавляли лизоцим из яичного белка (Gold Biotechnology Inc, США) до конечной концентрации 0.7 мг/мл, после чего полученную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C и затем однократно замораживали при –20°C и размораживали.

2) С помощью ультразвукового диспергирования (УЗД): клеточную биомассу ресуспендировали в 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) до финальной оптической плотности OD₆₀₀ = 20 о.е. Микропробирку (Eppendorf) с клеточной суспен-

зией фиксировали с помощью пробки в стакане, наполненном льдом. Диспергатор Branson Digital Sonifier 450Cell (Emerson, США) помещали в раствор так, чтобы в каждом эксперименте он был на одинаковой глубине и не касался стенок пробирки. Параметры диспергирования: время импульса – 5 с, промежуток между импульсами – 10 с, амплитуда – 35%, время диспергирования – 40 с.

3) С помощью экструзионного дезинтегратора (ЭД): клеточную биомассу ресуспендировали в PBS в объеме не менее 100 мл до финальной плотности OD₆₀₀ = 20 о.е. Клетки лизировали с использованием ЭД SPX Flow APV-2000 (SPX Flow Inc., США) с рабочим давлением 690 МПа (~10000 psi). Для полного разрушения проводили 3 последовательных цикла дезинтеграции. После каждого цикла отбирали пробу на анализ.

Заметим, что метод эструзионной дезинтеграции используют в промышленности [8], поэтому исследование по стабилизации АТВ в этих условиях важно с точки зрения масштабирования процесса разрушения клеток-продуцентов.

В результате дезинтеграции клеток (независимо от метода разрушения) получали клеточный лизат (Tot), который центрифугировали при 16100 g в течение 10 мин и собирали две фракции: растворимую (s) и нерастворимую (p). Для электрофоретического анализа использовали по 2.5 мкл соответствующей фракции.

Световая и флуоресцентная микроскопия

АТВ-формирующую активность целевых слитных белков, синтезируемых в клетках *E. coli*, оценивали с помощью световой и флуоресцентной микроскопии. Для этого выращенные клетки собирали центрифугированием в течение 3 мин при 9000 g и ресуспендировали в 50 мМ Трис-НCl (рН 8.0) до конечной плотности OD₆₀₀ = 10 о.е. и фиксирова-

ли на подложке, содержащей 1% агарозы (w/v). Образцы накрывали покровными стеклами и использовали для дальнейшего анализа. Изображения фиксированных клеток получали с помощью флуоресцентного микроскопа Olympus BX61 (Olympus, Япония) с цифровой микрокамерой Olympus DP71 (Olympus) при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 490/540$ нм.

Измерение флуоресценции

Для измерения флуоресценции целевого белкового образца в рабочую лунку черного планшета (Thermo Fisher Scientific, США) помещали 100 мкл PBS и 50 мкл целевого образца, тщательно перемешивали содержимое каждой лунки с помощью горизонтального шейкера. Измерения проводили при комнатной температуре на микропланшетном анализаторе Modulus II (TurnerBioSystems, США) при $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 490/(510-570)$ нм. Процентное содержание целевого слитного белка рассчитывали как отношение значения флуоресценции соответствующей фракции к сумме значений флуоресценции для растворимой и нерастворимой фракций данного образца.

Стандартные отклонения определяли как минимум в трех биологических повторах. В качестве отрицательных контролей использовали соответствующие фракции клеточного лизата клеток *E. coli*, трансформированных вектором pET28b+.

ПААГ-электрофорез

Содержание целевого рекомбинантного белка во фракциях клеточного лизата определяли методом электрофореза в 15%-ном полиакриламидном геле в денатурирующих восстанавливающих условиях (ДСН-ПААГ) с окрашиванием Кумасси G-250. Использовали предварительно окрашенные белковые маркеры (#26616, Thermo Fisher Scientific).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подходы к повышению стабильности АТВ

Очевидно, что стабильность формируемых в бактериальных клетках АТВ с целевым белком определяется платформой L₆KD-SUMO, модификация которой и стала предметом проведенного нами исследования. Следует отметить, что входящие в состав L₆KD-SUMO консервативные структурные элементы адаптерного белка SUMO ответственны за протеолитическое высвобождение целевого белка из состава АТВ, поэтому модификация этого звена платформы может негативно сказаться на процессе. Неструктурированные области SUMO предоставляют широкий выбор для внесения изменений, однако их поведение труднопредсказуемо и, вероятно, трудновоспроизводимо. В этой связи оптимальной мишенью для

модификации представлялся САП – ключевой элемент платформы, отвечающий за самосборку АТВ (мицеллообразование). САП пространственно отделен от целевого белка и, как мы полагаем, не влияет непосредственно на его сворачивание [1].

Очевидно, что для получения более прочных и устойчивых к механической дезинтеграции АТВ необходимы такие модификации САП, которые увеличат количество и/или интенсивность межмолекулярных взаимодействий. Однако расположение и специфику этих модификаций следовало установить экспериментально. В этой связи мы выбрали внесение следующих инсерций на N- или C-конец САП: (i) гидрофобных или заряженных аминокислотных остатков (а.о.) для усиления гидрофобных или ионных взаимодействий соответственно; (ii) остатков цистеина – для организации дисульфидных (ковалентных) связей.

Рассмотренные и проанализированные нами модификации САП указаны в табл. 2. Конструирование плазмид для синтеза АТВ на основе белков, включавших модифицированные САП, описано в разделе “Условия эксперимента”. Наличие в составе АТВ репортерного белка sfGFP позволяло с помощью измерения флуоресценции проводить количественный анализ распределения продуктов синтеза между соответствующими образцами и фракциями. Образцом сравнения служили АТВ на базе немодифицированного слитного белка L₆KD-SUMO-sfGFP. В качестве отрицательного контроля использовали растворимый белок His₁₀-SUMO-sfGFP, содержащий вместо САП N-концевую последовательность из 10 остатков гистидина (His₁₀).

Оценку эффективности внесенных в САП модификаций проводили поэтапно. Для этого клетки, выращенные в стандартных условиях, разрушали (1) ферментативно, с использованием лизоцима, не прибегая к механическому воздействию (ФД); (2) с помощью ультразвукового диспергирования (УЗД) и (3) с использованием ЭД.

Полученные лизаты разделяли центрифугированием, после чего по детектируемому уровню флуоресценции анализировали содержание продуктов целевого синтеза в различных фракциях. Стабильность АТВ оценивали по соотношению доли целевых молекул во фракции осадка (p) к их общему количеству в клеточном лизате (Tot).

В результате проведенного анализа клеточных лизатов показано, что независимо от метода разрушения клеток контрольный белок с N-концевой последовательностью His₁₀ присутствовал преимущественно во фракции растворимых клеточных белков (рис. 1). В то же время содержание целевого белка с N-концевым САП L₆KD во фракции нерастворимых белков изменялось в зависимости от метода получения лизата: от 40% (с использованием ЭД) до 80% (под действием лизоцима,

Таблица 2. Варианты модификации самоассоциирующих пептидов для повышения стабильности синтезируемых активных телец включения**Table 2.** Options for modification of self-aggregation peptides to increase the stability of synthesized active inclusion bodies (AIB)

№	САП	Характеристика
1	His ₁₀	Пептид обеспечивает синтез растворимой формы целевого белка – отрицательный контроль
2	L ₆ KD	Пептид обеспечивает синтез образца сравнения, описанного ранее [1, 7], – положительный контроль
3	L ₈ KD	Усиление гидрофобных взаимодействий за счет увеличения ядра САП
4	KDL ₆ KD	Внесение дополнительных ионных взаимодействий между противоположно заряженными а.о., размещенными на N-концах САП соседних мономеров
5	KDL ₈ KD	Комбинация модификаций САП-3 и САП-4
6	C ₂ L ₆ KD C ₃ L ₆ KD C ₄ L ₆ KD	Введение 2–4 остатков Cys на N-конец САП соседних мономеров для образования межмолекулярных дисульфидных связей
7	C ₂ G ₃ L ₆ KD	Вариант базового САП с 2 остатками Cys на N-конец, отделенными от гидрофобного ядра САП последовательностью из 3 остатков Gly
8	L ₆ KDGC ₂	Дополнение двумя остатками Cys на C-конец САП соседних мономеров, которые отделены от ядра САП линкером GlySer – для увеличения подвижности

ФД) (рис. 1). Эти результаты стали подтверждением доминирующего влияния САП на растворимость слитного белка SUMO-sfGFP, а также корректного выполнения всех аналитических процедур.

Влияние модификаций САП на синтез целевого белка и формирование АТВ

С целью подтвердить способность модифицированных САП поддерживать синтез целевого

белка и формирование АТВ клетки *E. coli*, трансформированные сконструированными экспрессионными плазмидами, растили в стандартных условиях и разрушали с использованием лизоцима, не прибегая к механическому воздействию.

При анализе ФД-лизатов показано, что базовый САП L₆KD и все варианты модифицированных САП направляли эффективный синтез АТВ (рис. 2). В то время как более 90% контрольного белка с N-концевой последовательностью His₁₀ со-

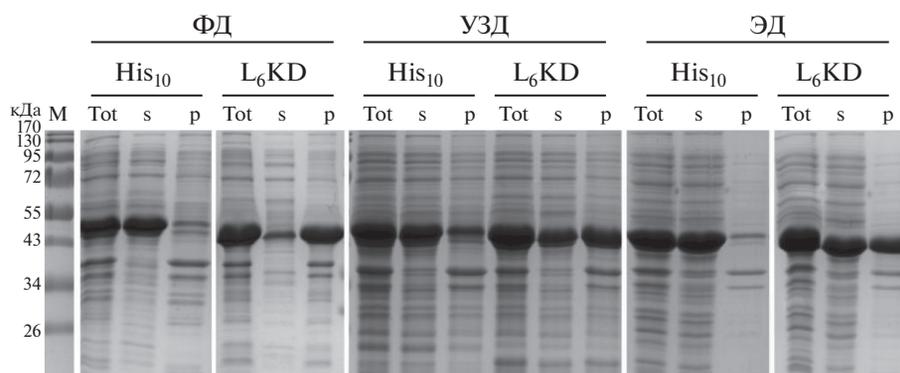


Рис. 1. Электрофореграмма фракций клеточных лизатов, полученных в результате разрушения клеток *E. coli* с использованием методов ферментативной дезинтеграции (ФД), ультразвукового диспергирования (УЗД) и экстракционной дезинтеграции (ЭД). Сравнивали 2 слитных белка: растворимый His₁₀-SUMO-sfGFP (His₁₀) и АТВ-формирующий L₆KD-SUMO-sfGFP (L₆KD). На гель нанесены образцы полного клеточного лизата (Tot), а также фракции растворимых (s) и нерастворимых (p) белков.

Fig. 1. SDS-PAGE analysis of cell lysate fractions obtained by disruption of *E. coli* cells using enzymatic disintegration, sonication and French press. Two fusion proteins were compared: soluble His₁₀-SUMO-sfGFP (His₁₀) and AIB-forming L₆KD-SUMO-sfGFP (L₆KD). Samples of total cell lysate (Tot) as well as fractions of soluble (s) and insoluble (p) proteins were applied to the gel.

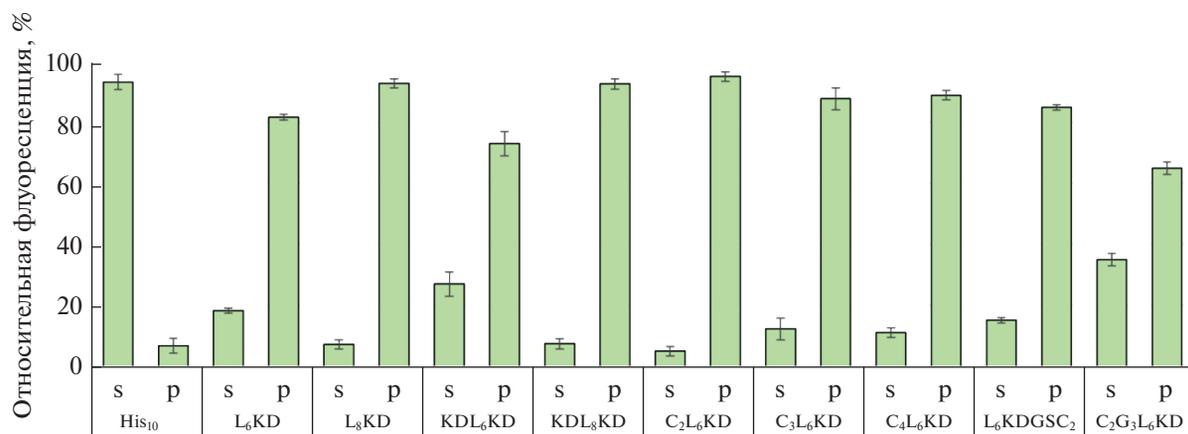


Рис. 2. Влияние модификаций САП на детектируемое по флуоресценции распределение АТВ между фракциями клеточных лизатов, полученных при ферментативной дезинтеграции *E. coli*. Обозначения (здесь и везде): s – фракция растворимых белков, p – фракция нерастворимых белков. В каждом случае за 100% принимали суммарную флуоресценцию клеточного лизата.

Fig. 2. Effect of SAP modifications on the distribution of AIB between fractions of cell lysates obtained by enzymatic disintegration of *E. coli*. Designations (here and everywhere): s, soluble protein fraction; p, insoluble protein fraction. In each case, the total fluorescence of the cell lysate was taken as 100%.

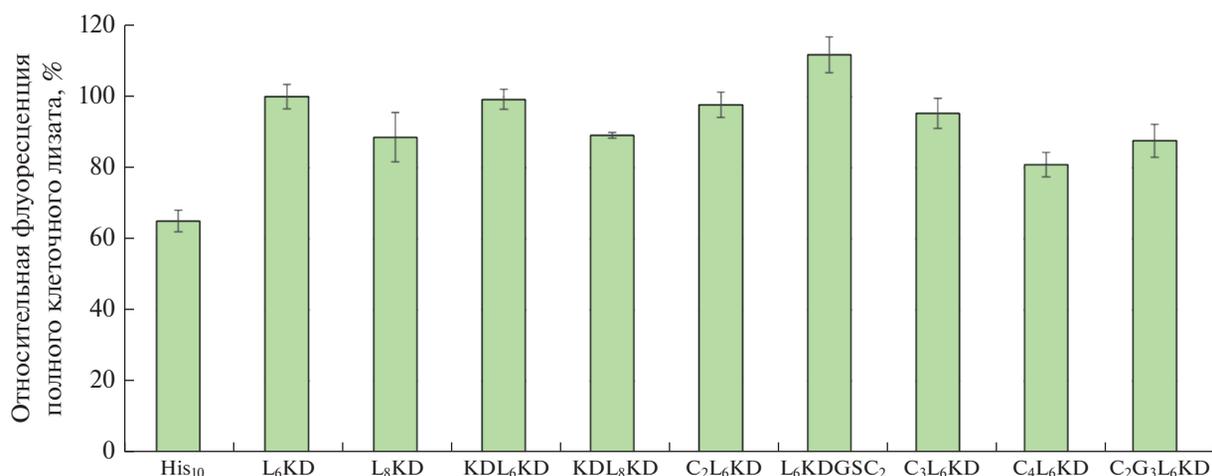


Рис. 3. Влияние модификаций САП на уровень синтеза целевых белков. Флуоресценция образца с исходным САП (L₆KD) принята за 100%.

Fig. 3. Effect of SAP modifications on the target protein synthesis. Fluorescence of the sample with the original SAP (L₆KD) was taken as 100%.

храняло высокую растворимость, все остальные конструкции с N-концевыми САП присутствовали преимущественно в нерастворимой фракции (рис. 2).

Необходимо отметить, что модификации САП оказывали некоторое влияние на общий уровень синтеза флуоресцентных конструкций (рис. 3). Так, использование САП с увеличенным гидрофобным ядром (L₈KD) снижало синтез целевого белка на 10%, а инсерция 2, 3 и 4 остатков цисте-

ина на N-конце приводила к снижению синтеза на 2, 5 и 20% соответственно.

Формирование АТВ было также подтверждено методом световой и флуоресцентной микроскопии (данные не приведены). Все модифицированные варианты САП приводили к появлению в клетках *E. coli* отдельных флуоресцирующих уплотнений, в то время как в клетках, синтезирующих контрольный белок с N-концевой последователь-

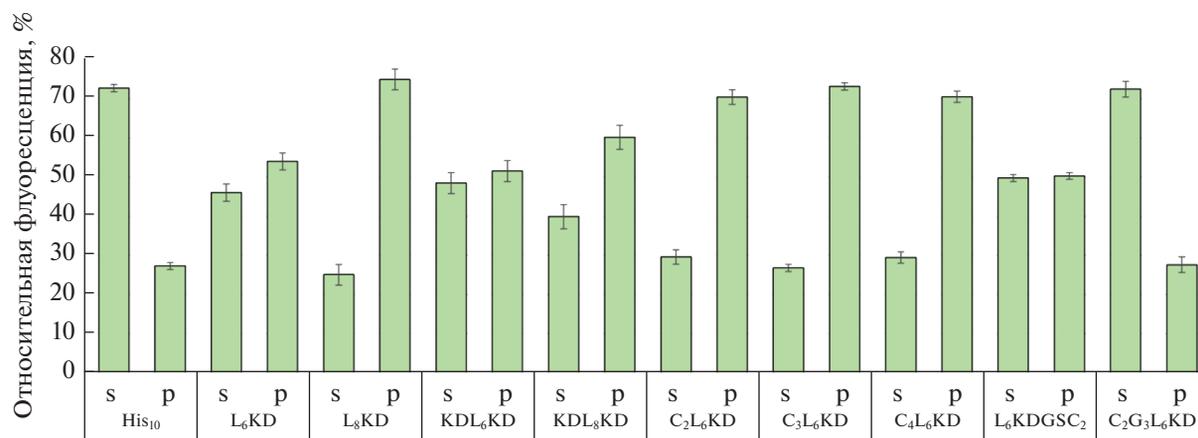


Рис. 4. Влияние модификаций САП на детектируемое по флуоресценции распределение АТВ между фракциями клеточных лизатов, полученных при дезинтеграции *E. coli* с использованием ультразвукового диспергирования. В каждом случае за 100% принимали суммарную флуоресценцию клеточного лизата.

Fig. 4. Effect of SAP modifications on the distribution of AIB between fractions of cell lysates obtained by sonication of *E. coli*. In each case, the total fluorescence of the cell lysate was taken as 100%.

ностью His₁₀, распределение флуоресценции было равномерным по всему объему.

Таким образом, на основании результатов анализа клеточных лизатов, полученных методом ФД, все модифицированные САП поддерживали синтез АТВ, но при этом по-разному влияли на уровень синтеза целевого белка в клетках *E. coli*, как это показано на рис. 3.

Влияние модификаций САП на стабильность АТВ в условиях УЗД

В отличие от лабораторного метода дезинтеграции клеток *E. coli* с использованием лизоцима, ультразвуковое разрушение (УЗД) представляет собой существенный шаг вперед в направлении масштабирования производства. В этой связи наиболее значимый показатель эффективности модифицированных САП – стабильность формируемых ими АТВ, полученных в условиях УЗД.

Для оценки стабильности модифицированных АТВ в условиях УЗД использовали те же серии образцов клеточной биомассы и те же подходы к оценке эффективности САП, как и при ФД. Полученные результаты представлены на рис. 4.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что использование УЗД для разрушения клеток привело к существенному изменению распределения целевых белков во фракциях клеточных лизатов по сравнению с ФД-методом. Так, растворимость контрольного белка с N-концевой последовательностью His₁₀ снизилась в условиях УЗД (<75%) по сравнению с ФД (>90%), а образцов АТВ на основе САП-содержащих бел-

ков, напротив, существенно увеличилась. Например, содержание контрольных АТВ с исходным САП L₆KD в растворимой фракции увеличилось более чем в 2 раза и практически сравнялось с долей АТВ, оставшихся в нерастворимой фракции (рис. 1, 2 и 4).

Интерпретируя снижение растворимости контрольного белка His₁₀-SUMO-sfGFP, мы предполагаем, что в условиях ультразвуковой обработки происходит его частичная денатурация [9]. Такой эффект может распространяться и на все белки, содержащие САП. Но наличие контрольных конструкций позволяет оценивать вклад каждой модификации САП в повышение стабильности АТВ.

На основании данных, представленных на рис. 4, можно прийти к следующему заключению:

✓ усиление ионных взаимодействий за счет инсерции N-концевых противоположно заряженных остатков, Lys и Asp, в KDL₆KD не влияет на стабильность АТВ;

✓ усиление гидрофобных взаимодействий за счет удлинения полилейцинового ядра САП положительно влияет на стабильность АТВ: по сравнению с контрольным САП L₆KD использование модифицированного L₈KD в условиях УЗД привело к увеличению содержания АТВ в осадочной фракции с 54 до 75%; аналогичный эффект зарегистрирован для САП KDL₆KD (52%) и KDL₈KD (60%);

✓ введение на N-конец САП от 2 до 4 остатков Cys привело к повышению стабильности АТВ. Содержание АТВ во фракции нерастворимых белков повышалось до 70% по сравнению с 54% для контрольного образца L₆KD; при этом увеличе-

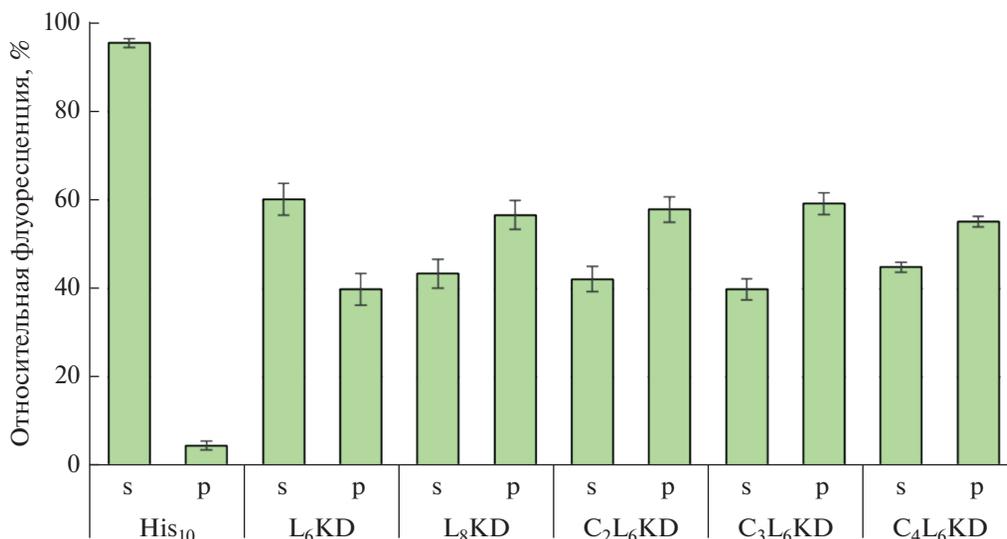


Рис. 5. Влияние модификаций САП, выбранных в УЗД-эксперименте, на распределение АТВ между фракциями клеточных лизатов, полученных при разрушении клеток *E. coli* с использованием экстразионного дезинтегратора. В каждом случае за 100% принимали суммарную флуоресценцию клеточного лизата.

Fig. 5. Effect of SAP modifications chosen in the previous sonication experiment on the distribution of AIB between fractions of cell lysates obtained by disruption of *E. coli* using French press. In each case, the total fluorescence of the cell lysate was taken as 100%.

ние числа остатков Cys не влияло на стабильность, но приводило к снижению продукции целевого белка (рис. 3). Интересно, что использование восстановителя 2-меркаптоэтанола в концентрации 2 мМ в составе буферного раствора для УЗД не приводило к снижению стабильности АТВ с Cys-содержащими САП. Это может быть результатом низкой проницаемости гидрофобного ядра АТВ для молекул восстановителя. Важно отметить, что повышение устойчивости АТВ за счет остатков Cys, по-видимому, подчиняется определенным структурным ограничениям. В частности, положительный эффект регистрировали только в том случае, когда остатки Cys находились непосредственно на N-конце САП (C₂L₆KD, C₃L₆KD, C₄L₆KD), в то время как их отдаление от гидрофобного ядра САП за счет глицинового линкера (C₂G₃L₆KD) или введение двух остатков Cys на C-конец (L₆KDGS₂) не только не приводило к увеличению стабильности АТВ, но даже вызывали ее заметное снижение.

Таким образом, проведенный анализ показал, что наиболее перспективными модификациями САП, повышавшими стабильность АТВ в условиях УЗД в 1.3–1.4 раза, были L₈KD, C₂L₆KD, C₃L₆KD и C₄L₆KD. Указанные САП были отобраны для завершающего этапа анализа в условиях разрушения клеток с помощью ЭД.

Влияние модификаций САП на стабильность АТВ в условиях обработки ЭД

Испытание стабильности АТВ, синтезированных на основе выбранных вариантов модифицированных САП: L₈KD, C₂L₆KD, C₃L₆KD и C₄L₆KD, — проводили с использованием ЭД APV-2000 (см. “Условия эксперимента”). Показатель давления для разрушения клеток *E. coli* (10 000 psi) был выбран в соответствии с литературными данными [10]. Высокая эффективность разрушения клеток в таких условиях была подтверждена в эксперименте с контрольным белком His₁₀-SUMO-sfGFP: после 1 цикла ЭД 96% флуоресцентного сигнала было ассоциировано с фракцией растворимых белков (рис. 1 и 5), что превышало показатели ФД (92%) (рис. 1 и 2).

Эффективность модифицированных САП оценивали в эксперименте с тремя последовательными циклами разрушения клеток с использованием ЭД. Как показал анализ клеточных лизатов, влияние модификаций САП на стабильность АТВ сохранялось только при первом цикле дезинтеграции, тогда как уже после второго цикла различия между опытными и контрольным образцами АТВ нивелировались. Мы предполагаем, что этот эффект вызван фрагментацией АТВ.

После первого цикла ЭД-обработки клеток *E. coli* в нерастворимой фракции присутствовало лишь 40% L₆KD-содержащих АТВ (контроль-

ный САП) от их общего содержания. В случае модифицированных САП этот показатель увеличивался почти в 1.5 раза – до 60% (рис. 5). Также следует отметить, что, несмотря на некоторое снижение содержания целевых АТВ во фракции нерастворимых белков после одного цикла ЭД (~60%) по сравнению с УЗД (~70%) (рис. 4 и 5), степень чистоты полученных препаратов АТВ была выше (рис. 1).

Таким образом, АТВ, сформированные модифицированными САП, выбранными в качестве перспективных на основании результатов УЗД, сохраняли стабильность и при обработке клеток *E. coli* с использованием ЭД. В этом случае повышение стабильности АТВ достигало почти 50%.

Таким образом, нами показано, что некоторые модификации САП, действительно, позволяют увеличить стабильность синтезируемых в *E. coli* АТВ в условиях ультразвуковой и экструзионной дезинтеграции клеток. Важно, что в лизате клеток *E. coli* распределение АТВ, сформированных отобранными перспективными модифицированными САП, было смещено в сторону фракции нерастворимых белков. Мы надеемся, что использование платформы с модифицированными САП (C₂L₆KD, L₈KD) снизит себестоимость производства целевых белков в биотехнологической промышленности.

Относительно исходного L₆KD эффект увеличения стабильности АТВ с модифицированными САП составил 30–50%. При этом достоверно эффективными оказались два типа модификаций: удлинение гидрофобного ядра САП и присоединение к N-концу САП 2–4 остатков цистеина. Принимая во внимание влияние САП на синтез целевого белка, наиболее перспективным вариантом САП представляется C₂L₆KD.

Мы считаем, что, несмотря на сходную эффективность, модифицированные варианты САП будут востребованы в разных областях. Так, удлинение гидрофобного хвоста не только повышает стабильность формируемых АТВ, но и стимулирует их самосборку в процессе внутриклеточного синтеза, что может негативно отразиться на сворачивании целевого белка в составе АТВ. В то же время введение в САП остатков цистеина, скорее всего, стабилизирует АТВ по завершении самосборки и, по-видимому, не влияет на сворачивание целевого белка. Предложенные нами модификации самоассоциирующих пептидов как платформы для сборки активных телец включения открывают большие перспективы для их применения в промышленном масштабе.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке тематического плана НИЦ “Курчатовский институт” за 2024 год.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Komolov A.S., Sannikova E.P., Gorbunov A.A., Gubaidullin I.I., Plokhikh K.S., Konstantinova G.E., Bulushova N.V., Kuchin S.V., Kozlov D.G. Synthesis of biologically active proteins as L6KD-SUMO fusions forming inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 2024, 121, 535–550.
<https://doi.org/10.1002/bit.28587>
2. Lin Z., Zhou B., Wu W., Xing L., Zhao Q. Self-assembling amphipathic alpha-helical peptides induce the formation of active protein aggregates *in vivo*. *Faraday Discuss.*, 2013, 166(10), 243–256.
<https://doi.org/10.1039/c3fd00068k>
3. Gorbunov A.A., Sannikova E.P., Gubaidullin I.I., Serobyan G.A., Gorbunova A.Y., Serkina A.V., Plokhikh K.S., Kamyshinsky R.A., Vorovitch M.F., Bulushova N.V., Kuchin S., Kozlov D.G. Vaccine building 'kit': combining peptide bricks to elicit a desired immune response without adding an adjuvant. *Nanomedicine*, 2022, 17(7), 461–475.
<https://doi.org/10.2217/nnm-2021-0424>
4. Jäger V.D., Lamm R., Küsters K., Ölçücü G., Oldiges M., Jaeger K.E., Büchs J., Krauss U. Catalytically-active inclusion bodies for biotechnology—general concepts, optimization, and application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020, 104(17), 7313–7329.
<https://doi.org/10.1007/s00253-020-10760-3>
5. Zhang S. Discovery and design of self-assembling peptides. *Interface Focus*, 2017, 7(6), 20170028.
<https://doi.org/10.1098/rsfs.2017.0028>
6. Lin Z., Zhao Q., Xing L., Zhou B., Wang X. Aggregating tags for column-free protein purification. *Biotechnol. J.*, 2015, 10(12), 1877–1886.
<https://doi.org/10.1002/biot.201500299>
7. Zhao X. Design of self-assembling surfactant-like peptides and their applications. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 2009, 14(5), 340–348.
<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.07.002>
8. Harrison S.T.L. Cell disruption. In: *Comprehensive Biotechnology*, 2nd edition. Academic Press, 2011, 619–640.
9. Stathopoulos P.B., Scholz G.A., Hwang Y.M., Rumpfolt J.A., Lepock J.R., Meiering E.M. Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci.*, 2004, 13(11), 3017–3027.
<https://doi.org/10.1110/ps.04831804>
10. Singh R.S. A comparative study on cell disruption methods for release of aspartase from *E. coli* K-12. *Indian J. Exp. Biol.*, 2013, 51(11), 997–1003.

Modification of Self-Aggregating Peptide L₆KD to Produce Active Inclusion Bodies in *Escherichia coli*

A. S. Komolov^{a, #}, I. I. Gubaidullin^{a, b}, A. Yu. Nikolaeva^a, E. S. Bobrov^a,
E. P. Sannikova^a, and D. G. Kozlov^a

^aNational Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 123182 Russia

^bKurchatov Genomic Center, National Research Center “Kurchatov Institute” – GOSNIIGENETIKA, Moscow, 117545 Russia

[#]e-mail: askomolov@mail.ru

Abstract—Synthesis of biologically active recombinant proteins and peptides in the form of active inclusion bodies (AIB) solves the problem of production cost reduction. Previously, we developed an original platform for the production of AIB in *Escherichia coli* cells. It included the N-terminal self-aggregating peptide (SAP) L₆KD fused to the SUMO (Smt3) protein of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, known for its chaperone activity. AIBs synthesized using this platform were shown to be sensitive to sonication and extrusion of cells under pressure, which led to losses at the stage of fractionation of the cell lysate. Here, in order to increase the strength of AIBs, we investigated modifications of the original SAP. In particular, we increased the hydrophobic core of SAP and also tried to supplement the intermolecular interactions between SAPs with disulfide or ionic bonds. The best results were detected for peptides with increased hydrophobic tail (L₈KD) as well as for those containing sequences of 2–4 cysteine residues directly at the N-terminus of the hydrophobic core of SAP (C₂L₆KD, C₃L₆KD, C₄L₆KD). Integration of cysteine residues at a distance from the hydrophobic core of SAP (C₂G₃L₆KD, L₆KDGC₂), as well as the formation of additional ionic bonds (KDL₆KD, KDL₈KD) did not lead to an increase in the stability of AIB. It was shown that the proposed SAP modifications practically did not effect the synthesis of the target protein. Under sonication process, the best SAP variants increased the AIB yield by 30–40%. This effect was also maintained under extrusion disintegration of *E. coli* using a high-pressure homogenizer.

Keywords: recombinant protein, self-aggregating peptide, active inclusion bodies, biologically active protein, *Escherichia coli*, cell disintegration